



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사학위논문

Arabidopsis ecotypic variation of protein contents

애기장대 생태형에 따른 단백질 함량 차이에 관한
연구

2019년 8월

서울대학교 대학원

생명과학부

봉 성 연

애기장대 생태형에 따른 단백질 함량 차이에 관한 연구

Arabidopsis ecotypic variation of protein contents

지도교수 최 성 화

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함
2019년 8월

서울대학교 대학원
생명과학부
봉 성 연

2019년 6월

위 원 장 _____ 이 지 영 _____ (인)

부위원장 _____ 최 성 화 _____ (인)

위 원 _____ 홍 기 중 _____ (인)

초 록

애기장대는 십자화과에 속하며 분자유전학 연구에 적합한 모델 식물이다. 식물 크기가 작고 세대 기간이 짧으며 통계 분석이 가능한 많은 씨를 생산할 수 있다. 다른 식물과 비교하여 유전체 사이즈가 작으며 주로 이배체 특성으로 있다. 비식용 식물을 이용하여 비의도적으로 환경에 방출되어도 인체에 섭취할 위험성이 낮고, 재배 조건이 잘 확립되어 있으며 낮은 광원으로 효율적 재배가 가능하다. 식물공장내의 재배면적을 최대한 활용하여 단위면적당 최적의 재배량을 확보 가능하다. 다양한 생태형이 존재하여 단백질 발현을 위한 최적의 생태형 선별이 가능하고, 애기장대 게놈서열 분석완료에 따른 식물특이 당채구조 변이를 위한 유전정보 활용이 용이하다는 장점이 있다. 이러한 장점으로 인해 식물 생물학의 모든 측면에서 모델 시스템 역할을 한다. 아그로박테리움은 일시적 유전자 발현을 하기 위하여 DNA 를 식물 조직에 전달하는 매우 빠르고 간단한 방법이며 많은 처리량을 자랑한다. 일시적인 발현 실험에 앞서 먼저 1 차적으로 여러 애기장대 생태형을 대상으로 서로 다른 생태형의 생장 패턴과 표현형 관찰을 통하여 일차적으로 식물 재조합 단백질 발현 시스템 적용에 유용한 (유전자 발현 면적 측면을 고려, 식물의 잎이 크고 넓은 것) 생태형(약 200 여 종)을 선별하였다. 이들 생태형(21 종, Col-0 포함)을 통제된 배양 환경에서 배양 한 후 잎길이, 잎넓이, 잎면적,

잎자루, 잎의 개수(rosette)을 측정하고 아그로박테리움을 이용한 일시적 발현 방법을 통한 외래유전자의 도입 효율 및 도입 유전자들의 단백질 발현 양상을 검증하고자 진행 중에 있다.

주요어 : 애기장대 생태형, 아그로박테리움, 화침법, 단백질 발현, 형질전환

Student ID : 2015-22635

목 차

초 록.....	1
목 차.....	3
LIST OF FIGURE AND TABLE.....	5
1. 서 론	7
2. 실험 재료 및 방법.....	13
2-1. 식물 재료 및 생장 조건.....	13
2-2. 애기장대 표현형 분석.....	14
2-3. 애기장대 형질 전환체 제작	14
2-4. 애기장대 형질전환체 선별 및 형질전환 효율 측정	15
2-5. 식물 단백질 추출	15
3. 결 과	17
3-1. 단백질 발현에 최적 애기장대 생태형 선별을 위한 애기장대 선발	17
3-2. 애기장대 생태형별 잎 크기 분석.....	20
3-2.1. 애기장대 생태형 잎 길이 분석.....	20
3-2.2. 애기장대 생태형 잎 가로 분석.....	24
3-2.3. 애기장대 생태형 잎자루 길이 분석.....	28
3-2.4. 애기장대 생태형 잎면적 분석	32
3-3. 로제트 잎 개수 및 생체량 분석	35

3-3.1. 애기장대 생태형 로제트 잎 개수 분석	35
3-3.2. 애기장대 생태형 생체총량 분석	39
3-4. 애기장대 생태형별 단백질 함량	42
3-5. 생태형 형질전환 효율 분석	46
4. 논 의	49
5. 참고문헌.....	53
6. ABSTRACT IN ENGLISH	59

LIST OF FIGURES AND TABLE

그림 1. 애기장대 생태형의 형태학적 앞길이 표현형 비교

그림 2. 앞길이가 긴 생태형 순서

그림 3. 애기장대 생태형의 형태학적 앞가로 표현형 비교

그림 4. 앞가로는 긴 생태형 순서

그림 5. 애기장대 생태형의 형태학적 앞자루 표현형 비교

그림 6. 앞자루가 긴 생태형 순서

그림 7. 애기장대 생태형의 형태학적 앞 면적 표현형 비교

그림 8. 앞 면적이 넓은 생태형 순서

그림 9. 애기장대 생태형의 형태학적 로제트 잎 개수 비교

그림 10. 애기장대 생태형의 형태학적 생태총량 비교

그림 11. 애기장대 생태형 잎의 1 g당 단백질 양 비교

그림 12. 애기장대 생태형 전체 단백질의 SDS-PAGE 젤 비교

그림 13. 애기장대 생태형의 형질전환 효율 비교

표 1. 선별된 20 종의 애기장대 생태형들

표 2. 생태형 앞 길이 분석표

표 3. 생태형 앞 가로 분석표

표 4. 생태형 앞자루 길이 분석표

표 5. 생태형 앞면적 분석표

표 6. 생태형 로제트 잎 개수 분석표

표 7. 생태형 생체총량 분석표.

표 8. 생태형 1g당 단백질 양 분석표

표 9. 생태형 형질전환 효율 분석표

1. 서론

식물계는 우리 지구의 대부분의 생물 자원과 생태권을 구성한다. 식물의 거대한 다양성과 다양한 환경에 적응할 수 있는 능력으로 인해 식물 모델 생물을 연구하는 것은 동물에 대한 연구에 비해 상대적으로 새로운 접근법이었다.

1980 년대까지, 식물에 대한 연구는 주로 경제적으로 중요한 작물에 집중되어 있었고 작물 개선에 의한 수확량 증가 가능성에 국한되어 있었다. 일부 주요 작물을 포함하여 많은 식물은 대개 반복적인 DNA 를 포함하는 큰 배수체 게놈(genome)을 가지고 있는 것을 알게 되었다. 이러한 이유들로 인해 유전 및 분자 연구가 어렵고 식물 게놈(genome) 분석과 조작을 방해한다고 생각했다. 따라서 식물 군락을 위한 이상적인 실험 모델 시스템으로 분자 유전 연구를 위한 단순한 게놈(genome)을 가진 유기체가 필요하였다.

작은 겨자 잡초인 애기장대(Brassicaceae 계통)는 식물 학자들에게 적어도 4 세기 동안 함께 하고 반세기 동안 실험적 연구에 사용되어왔다 처음 Friedrich Laibach 에 의해 1943 년에 식물 모델 시스템으로 제안 되었다. 애기장대는 작은 크기(최적 성장 조건 하에서 5-6 주)와 빠른 생성 시간으로 고전 유전학 실험에 적합 하며, 통제된 조건 하에서 잘 자랄 수 있는 능력(토양, 정제된 용매), 높은

생산력(식물 당 최대 10,000 개의 종자), 쉽게 돌연변이를 유지(자가수정) 그리고 이종교배의 장점이 있다.

고전 유전학을 위한 모델 시스템의 모든 주요 특징들을 가지고 있을 뿐만 아니라 애기장대는 알려진 고등 식물보다 가장 작은 식물 게놈(125Mb)을 가지고 있으며, 분자 연구 및 분자 연구 기반 클로닝을 할 수 있다. 또한, 애기장대는 아그로박테리움 매개 유전자 전달에 의해 쉽게 변형 될 수 있는 장점이 있다. 이는 많은 분자 유전 실험을 위한 좋은 조건이 되었다. 애기장대가 고전적 유전학 연구에 오랫동안 사용되어 왔지만 그 역할은 체계적으로 연구되어 온 *Drosophila* 의 발달 및 대사 과정 분석과 비교 될 순 없었다. 하지만 애기 장대는 작은 게놈을 가지고 있었기 때문에 고전 유전학을 분자 연구와 결합시킬 수 있는 잠재력이 있어 가장 많이 연구 된 식물이 되었다.

애기장대(*Arabidopsis thaliana*)는 현대 유전학의 최전방에 있다. 수십 년 간의 연구로 우리에게 식물의 생리와 발달을 알려줬을 뿐만 아니라 야생 개체군이 어떻게 비 생물 환경에 생물학적으로 적응할 수 있는지에 대한 통찰력을 제공하였다. 애기장대를 통하여 GWAS(genome-wide association study)의 주요 이점을 살리게 되었고 보완적인 forward genetics 의 접근을 가능하게 하였다: 다양한 생태적 조건 하에서 자연 선택의 산물인 자연계 근친 교잡 계통(수령)의 대량 수집을 가능하게 되었다. 이러한 결과로 실험실과 현장에서 유전형과 표현형을 연결시켜주는 기능을 가능하게 하였다

(Aranzana et al., 2005; Atwell et al., 2010; Fournier Level et al., 2011; Hancock et al., 2011).

유전적으로 동일한 개체에 대한 분자 데이터(예: RNA 발현, 후성 유전의 마커) 매커니즘으로 다른 다세포 종에서보다 훨씬 쉽게 밝혀질 수 있었고, 이러한 기본 자원으로 서로 다른 현장에서 얻어진 연구를 통하여 완벽한 게놈 서열을 가진 일련의 수용체임을 알게 되었다. 애기장대에서 게놈(genome) 다형성의 체계적인 특성 분석은 인간과 평행을 이루며 노력 하였다 (Birney and Soranzo, 2015).

식물 연구에서 잎의 전체적인 패턴이 어떻게 형성되는지 그리고 잎의 시작과 형태 형성의 수준에 대한 많은 의문점이 남아 있었다. 그러나 지난 10 년 동안, 잎 일대기에서 작용하는 기작은 다른 식물 종 연구에 의해 얻어졌다 (reviewed in Hake and Sinha 1991; Smith and Hake 1992; Sinha et al. 1993; Telfer and Poethig 1994; Tsukaya 1995; Hall and Langdale 1996; Sylvester et al. 1996; Poethig 1997; Brutnell and Langdale 1998; Tsiantis and Langdale 1998; Van Lijsebettens and Clarke 1998; Scanlon 2000; Byrne et al. 2001).

이 문제를 조명하고 발표 된 연구의 대부분은 잎의 개체 발생과 관련된 유전자의 동정하여 돌연변이를 분리함으로써 잎의 발생 원인을 분석했다. 그럼에도 불구하고, 다양한 잎 구조는 실험적으로 변형된 돌연변이와 자연 종의 다양한 종류에서도 발견 되었다. 특정 변이

연구의 다양한 시스템 범위와 식물 기원 형성을 제어하는 유전자를 확인하기 위한 연구에 접근하기 시작했다.

자연적 변이에 대한 연구는 모델 시스템인 애기장대에서 일부 발달 과정의 유전적 기초를 분석하는데 유용하다는 것이 증명되었다. 애기장대 이중교배 자손의 분석은 유전자 조사의 큰 공헌을 남겼는데 이는 특정 형질이 다른 생태형(ecotype)이라고 불린다.

이러한 접근은 FLOWERING ALTERED 와 같은 개화시기를 제어하는 단일 유전자를 동정 할 수 있었고 (FLA; Lee et al. 1993), 또한 FRIGIDA 라고도 불렀다 (FRI; Clarke and Dean 1994; Sanda et al. 1997; Johanson et al. 2000); AERIAL ROSETTE (ART); 그리고 ENHANCER ROSETTE (EAR; Grbic and Bleecker 1996). 또한, 양적 형질 유전자좌 (QTL) 분석은 일부 발달 과정에 관여하는 새로운 유전자의 동정에 유용함을 보였는데 EARLY DAY-LENGTH INSENSITIVE (EDI), FLOWERING F (FLF), FLG, FLH (Alonso Blanco et al. 1998), 개화시기에 영향을 미치는 ROSETTE LEAF NUMBER (RLN1-RLN5) loci (Clarke et al. 1995), vernalization responsiveness(춘화처리 민감성)에 영향을 미치는; REDUCED TRICHOME NUMBER gene (RTN; Larkin et al. 1996), 식물 성장과 관련된 잎의 trichomes 수에 영향을 미치는; 종자 올리고당 저장 능력에 영향을 미치는 4 개의 QTL [Bentsink et al. 2000; ESPRESSO (ESP), ANDANTE (AND), NON TROPO (NOT), RALENTANDO

(RAN)]; circadian rhythm 에 영향을 미치는 QTL (Swarup et al. 1999); 종자 크기에 영향을 미치는 11 개의 유전자좌 (Alonso-Blanco et al. 1999); 여러 가지 꽃과 관련된 11 QTL (Juenger et al. 2000); 화서 발달 형질에 대한 110 QTL (Ungerer et al. 2002); 빛과 호르몬 반응에 영향을 미치는 12 QTL (Borevitz et al. 2002) 등을 알게 되었다.

분자 기술의 발달과 게놈 프로젝트가 제공하는 정보와 함께 QTL 간격의 Mendelization 을 가능하게 했다. 이것은 기본 유전자의 위치를 복제하는 도구의 역할을 했다. 예로 토마토의 fw2.2 유전자와 애기장대의 EDI locus, QTL 의 CRYPTOCHROME2 (CRY2) 유전자의 새로운 대립 유전자로 밝혀졌다 (El-Din El-Assal et al. 2001).

개화 시기, 옥신 반응, 일주기성, 자스몬산 반응, 살리신산 반응, 빛 반응, 추위 스트레스와 같은 다양한 형질의 자연적인 변이에 대해서도 많은 연구가 이뤄지고 있다. 2013 년에 발표된 Perez and Perez 의 논문에서는 전체 188 종류의 애기장대 생태형의 영양 잎 구조의 변이에 관하여 연구해왔으며 잎자루 길이, 잎 가장자리 형태(marginal configuration), 전체 엽육 형태를 근거로 14 개의 표현형 그룹을 정량적으로 분류했다. 2006 년에 발표된 Schmuths 의 논문에서는 73 종류의 애기장대 생태형의 발아율에 관한 변이에 대해 연구하였다

애기장대 생태형에서 형질전환이 성공적으로 일어났을지라도 Ler-0 와 C24 와 같은 다른 생태형에서는 형질전환이 효율적으로 일어나지

않았다 (Clough and Bent, 1998, Ghedira et al., 2013). 따라서 애기장대 형질전환의 효율은 형질전환 방법뿐만 아니라 생태형의 종류 및 각 생태형의 생리학적인 특징에 의해서 결정된다. 생태형을 선발할 경우 형질전환 효율이나 단백질의 생산면에서 매우 적합한 생태형을 찾을 수 있을 것이다. 아그로박테리움에 대한 애기장대의 화합성과 민감성은 생태형마다 다르며 그 결과로서 아그로박테리움을 이용해 유전자를 형질전환 시키는 화침 방법 (floral dip)의 효율성 또한 생태형마다 다를 수 있다. 아그로박테리움에 대한 화합성과 민감성의 자연적인 변이는 아직 연구가 잘 되어 있지 않다. 따라서 애기장대 생태형에서 화침 방법 (floral dip) 형질전환의 효율성에 관한 연구는 아그로박테리움에 대한 화합성과 민감성의 자연 변이에 대한 지식을 쌓는데 매우 중요할 뿐만 아니라 현재 많은 노동력과 특이적 유전자 형질전환을 위해 많은 양의 고품질 종자 및 선택 배지를 필요로 하는 생태형의 낮은 형질 전환율을 극복하기 위한 새로운 애기장대 생태형을 발굴하는데도 중요하다. 커다란 잎을 지닌 고효율의 생태형을 찾는다면 아그로박테리움과 다른 벡터 시스템을 사용한 일시적 발현 (transient expression)에 이용할 수 있다

2. 실험 재료 및 방법

2.1 식물 재료 및 생장 조건

애기장대 종자 21 종의 종자는 선행 연구과정에서 국립농업과학원 등으로부터 확보하여 소속 기관에서 보관중인 종자를 실험에 사용하였다 (표 1 참조).

애기장대 종자는 파종 전 클린 벤치에서 3 분간 표면살균 (70 % 에탄올, 0.05 % Triton X-100)한 후, 멸균된 여과지 위에서 10 분간 건조시켰다. 이 후, 종자를 0.5X MS 배지(1.1 g/L Murashige and Skoog nutrient mix [Duchefa], 1 % sucrose, pH 5.7, 0.8 % agarose)에 파종 후, 마이크로포어 테이프로 밀봉하고 호일로 감싸 빛을 차단한 후 약 3 일 동안 4 °C에서 저온처리 하였다. 저온처리 후, 호일을 제거하고 25°C 배양실에서 광주기 16 시간/8 시간 (광/암)으로 일주일 동안 배양하였다. 발아 후 7~10 일이 지난 유식물은 상토(SUNGROW #4,)로 옮긴 후, 같은 조건에서 배양하며 생장을 관찰하였다.

2.2 애기장대 표현형 분석

표현형 측정은 발아 후 3 주된 식물체의 각 부위를 사진으로 찍은 후, ImageJ 프로그램을 이용하여 잎 길이, 잎자루 길이 등을 분석하였다. 로제트(rosette) 잎 개수는 직접 측정하였고, 생체량(fresh weight)은 식물체의 지상부 무게를 측정하였다. 측정된 결과값들의 통계처리는 엑셀(Excel, Microsoft)을 이용하였다.

2.3 애기장대 형질 전환체 제작

발아 후, 약 5 주간 배양한 애기장대 생태형 21 종을 형질전환에 사용하였다. 형질전환에는 GUL1::GUL1-GUS 재조합 DNA 를 사용했고, 재조합 DNA 를 포함하는 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)을 항생제(50 μ g/mL kanamycin, 25 μ g/mL rifampicin, 25 μ g/mL gentamycin)를 포함하는 액체 YEP 배지(배지조성 첨가: 1 % yeast extract, 1 % tryptone peptone, 0.5 % NaCl, pH 7.0) 100 mL 에 하루 동안 배양하였다. 배양액의 흡광도를 측정하여 OD600= 0.8 이 되었을 때, 배양을 멈추고 원심분리기를 이용하여 (3,000 rpm, 10 분) 세포들을 수확했다. 수확한 세포들은 5% sucrose 용액에 부드럽게 현탁시키고, 0.02% Silwet L-77 (vol/vol)을 섞어주었다. 애기장대 형질전환은 화침법 (floral-dipping; Xiuren Zhang et al., 2006)을 사용했고, 형질전환 직후 플라스틱 덮개를 씌워

식물 건조를 방지하였다. 다음날, 덮개를 제거하고 배양실로 옮긴 후, 3 일 후 장각(siliques)을 제거하고 화침법으로 한번 더 형질전환 시켰다.

2.4 애기장대 형질전환체 선별 및 형질전환 효율 측정

형질전환 시킨 애기장대(T0 세대)를 한달 정도 배양한 후, 종자를 수확하여 형질전환체 선별에 사용하였다 (T1 세대). 수확한 종자는 상온에서 10 일간 건조시킨 후, 항생제(50 $\mu\text{g/mL}$ hygromycin, 100 $\mu\text{g/mL}$ carbenicillin, 10 $\mu\text{g/mL}$ Basta)를 포함하는 0.5X MS 선별 배지에 표면살균 후, 약 1,000 개를 파종하고 5 일 후 발아한 종자수를 측정하고, 다시 5 일 후에 새롭게 발아한 종자수를 측정하여 형질전환율을 결정하였다. 반복 실험은 표현형 분석결과, 측정값 상위 6 종의 생태형에 대해서 1 차때와 동일한 조건으로 진행하였다.

2.5 식물 단백질 추출

단백질 추출은 발아 후, 5 주된 애기장대 전체 로제트 잎을 사용하였다. 수확한 잎 전체를 액체 질소 하에서 곱게 갈아준 후, 0.03g 조직 분말과 50 μL RIPA 버퍼(125 mM Tris pH 7.6, 750 mM NaCl, 5% NP-40, 5% sodium deoxycholate, 0.5% SDS)를 1.5 mL 마이크로 튜브에 옮긴 후, 얼음에서 10 분간 처리하였다 이 후,

원심분리(13,000 rpm, 4℃, 10 분)를 통해 분리된 상층액을 새 튜브로 옮겨 얼음에 보관하였다. 브래드포드법을 이용하여 단백질 농도를 측정하고, 동량(12 μ g)의 전체 단백질을 5x 단백질 sample 버퍼 (60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 혼합한 후, 95℃에서 10 분간 처리하고 12% SDS-PAGE 에서 단백질들을 분리하였다. 전기영동이 끝나 겔은 Coomassie blue 염색용액(0.1 % Coomassie Blue G-250, 50% methanol/ 10% acetic acid)으로 40 분간 염색하고, 세척 후 탈염색용액 (40 % methanol, 10 % glacial acetic acid)으로 15 분간 4 회 처리하였다.

3. 결 과

3.1 단백질 발현에 최적 애기장대 생태형 선별을 위한 애기장대 선발

단백질 발현에 적합한 애기장대 생태형 선별을 위해, 먼저 선행 연구과정에서 225 종의 다른 애기장대 생태형의 발달 패턴을 분석하고 성장 속도, 잎의 개수, 잎의 크기 등에 따라 분류하였다. (자료미제시)

각각의 종자를 지역별 특성에 따라 분리한 후 문헌조사를 통하여 생태형 별 성장 차이를 체크 하였다 28 개 생태형 잎이 큰 형태를 보였고, 그 중 4 개는 잎이 큰 동시에 잎의 수가 비교적 많았다 (자료미제시). 잎이 크거나, 수가 많은 생태형은 평균적으로 성장 속도가 비교적 느리고 종자를 적게 맺었다. 따라서 잎이 크고 수가 많은 생태형 중 성장속도가 가장 빠른 애기장대 생태형을 분석한 후 이들 중 21 종을 최종 실험 대상으로 결정해 이 후 실험을 진행 하였다 (자료미제시).

애기장대의 서로 다른 생태형의 성장 패턴과 표현형 관찰을 통하여 일차적으로 식물발현 시스템 적용에 유용한 (유전자 발현 면적 측면을

고려 식물의 잎이 크고 넓은 것) 생태형들 (21 중, Col-0 포함)을
선별하여 이들 생태형들을 통제된 환경에서 키워 아그로박테리움을
이용한 형질전환 방법을 검증하였다. (표 1)

표 1. 선별된 20 종의 애기장대 생태형 (Col-0 제외).

Plant ID	Name	Abber. Name	Parent line	Background	Country of origin	Location
JL00370.1	Argentat	Ag-0	CS22630	Ag-0	France	Argentat
JL00398.1	Angleur	Ang-1	CS6606	Ang-1	Belgium	Angleur, Prov. de Liege
JL00435.1	Lezoux	Lz-0	CS22615	Lz-0	France	Lezoux
JL00449.1	Frankfurt	Fr-2	CS6708	Fr-2	Germany	Frankfurt
JL00458.1	Märkt	Mrk-0	CS22635	Mrk-0	Germany	Markt/Baden
JL00468.1	Bennekom	Benk-2	CS22531	Benk-2	Netherlands	Bennekom-Halderhof
JL00472.1	Martha's Vinyard	Mv-0	CS6914	Mv-0	USA	Martha's Vineyard, MA
JL00497.1	Br	Br-0	CS6626	Br-0	Czech Republic	Brunn
JL00498.1	Br	Br-0	CS22628	Br-0	Czech Republic	Brunn
JL00510.1	Holtensen	Hl-0	CS6737	Hl-0	Germany	Holtensen
JL00513.1	Oldenburg	Old-1	CS6820	Old-1	Germany	Oldenburg
JL00517.1	Oystese	Oy-0	CS22658	Oy-0	Norway	Oystese
JL00526.1	Champex	Cha-0	CS6662	Cha-0	Switzerland	Champex
JL00528.1	Hodja-Obi-Garm	Hodja-Obi-Garm	CS6178	Hodja-Obi-Garm	Tadjikistan	Hodja
JL00546.1	CIBC	CIBC1	CS22220	CIBC1	United Kingdom	Ascot, Berks
JL00590.1		PHW-30	CS6086	PHW-30	United Kingdom	Redding, Hampshire
JL00604.1	Do	Do-0	CS6683	Do-0	Germany	Donsbach/Westerw.
JL00610.1	Kondara	Kondara	CS22651	Kondara	Tadjikistan	Khurmatov
JL00620.1	Rome	Rome-1	CS22524	Rome-1	Italy	Rome

3-2 애기장대 생태형별 잎 크기 분석

3-2.1 애기장대 생태형별 잎 길이 분석

저온에서 이틀 처리 후 배양실로 옮기고 플레이트에서 발아를 확인한 다음 토양으로 옮긴 후 1 주된 식물체들의 평균 잎 길이(leaf length)는 대부분 0.6 cm를 넘었고, 발아 후 2 주가 되었을 때 생태형 370.1, 610.1, 528.1 의 잎 길이는 0.9 cm를 넘는 것으로 측정되었다(그림 1).

21 종 생태형의 잎 길이의 평균과 중간값은 각각 0.84 cm 와 0.85 cm 였다. 측정된 생태형들 중 상위 20 %의 평균 잎 길이는 1.03 cm 였으며, 하위 20 %의 평균은 0.61 cm 로 나타났고, 최상위값을 보인 생태형(370.1)과 최하값의 생태형(398.1)간 차이는 0.49 cm 로 확인되었다(표 2).

표 2. 생태형 잎 길이 분석표. (단위 cm).

Ecotype	평균	표준편차
Col-0	0.77	0.03
458.1	0.99	0.01
513.1	0.98	0.04
590.1	0.82	0.03
604.1	0.87	0.01
526.1	0.66	0.06
620.1	0.60	0.04
546.1	0.74	0.10
517.1	0.79	0.01
498.1	0.61	0.05
398.1	0.59	0.04
610.1	1.07	0.04
449.1	0.90	0.06
482.1	0.89	0.03
435.1	0.88	0.07
510.1	0.82	0.03
528.1	1.00	0.11
468.1	0.98	0.13
497.1	0.94	0.03
370.1	1.07	0.03
472.1	0.88	0.02

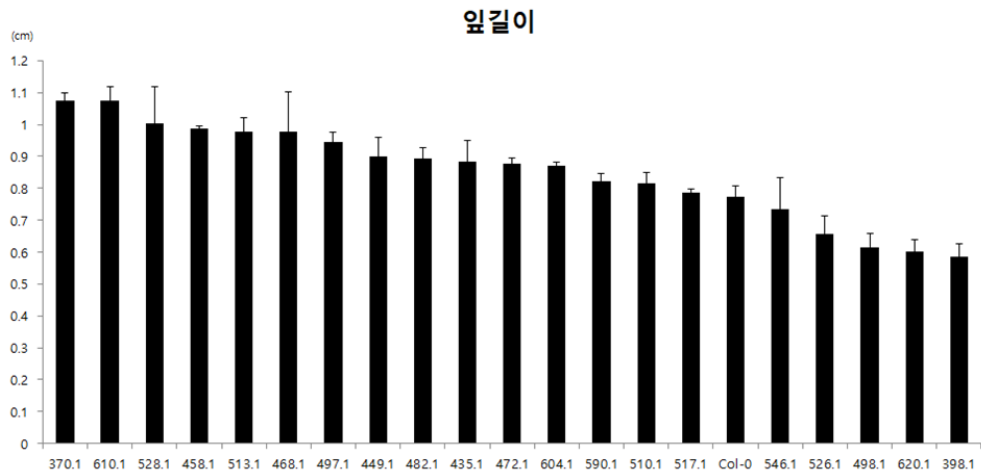


그림 1. 애기장대 생태형의 형태학적 앞길이 표현형. X축 애기장대 생태형. Y축 앞길이. 각 막대는 앞길이를 나타냄. N=9-18



그림 2. 애기장대 생태형을 하프 MS 플레이트에서 토양으로 이식 한 후 1 주후에 찍은 사진. 앞길이가 긴 생태형 순서. Col-0 컨트롤. 스케일바 1cm

3-2.2 애기장대 생태형 잎 가로 분석

21 종 생태형의 평균 잎 너비는 0.57 cm 였고, 중간값은 0.57 cm 로 확인되었다(그림 3). 측정한 생태형들 중 상위 20 %의 평균 잎 너비는 0.71 cm 였고, 하위 20 %의 평균은 0.47 cm 였으며, 최상위값을 보인 생태형(435.1)과 최하값의 생태형(526.1)간 차이는 0.31 cm 로 확인되었다(표 3).

표 3. 생태형 잎 가로 분석표. (단위 cm).

Ecotype	평균	표준편차
Col-0	0.508	0.022
458.1	0.571	0.018
513.1	0.666	0.002
590.1	0.610	0.014
604.1	0.690	0.013
526.1	0.414	0.067
620.1	0.491	0.018
546.1	0.580	0.051
517.1	0.597	0.013
498.1	0.525	0.021
398.1	0.469	0.013
610.1	0.582	0.022
449.1	0.603	0.028
482.1	0.548	0.043
435.1	0.722	0.063
510.1	0.515	0.006
528.1	0.531	0.026
468.1	0.625	0.066
497.1	0.710	0.088
370.1	0.681	0.032
472.1	0.698	0.017

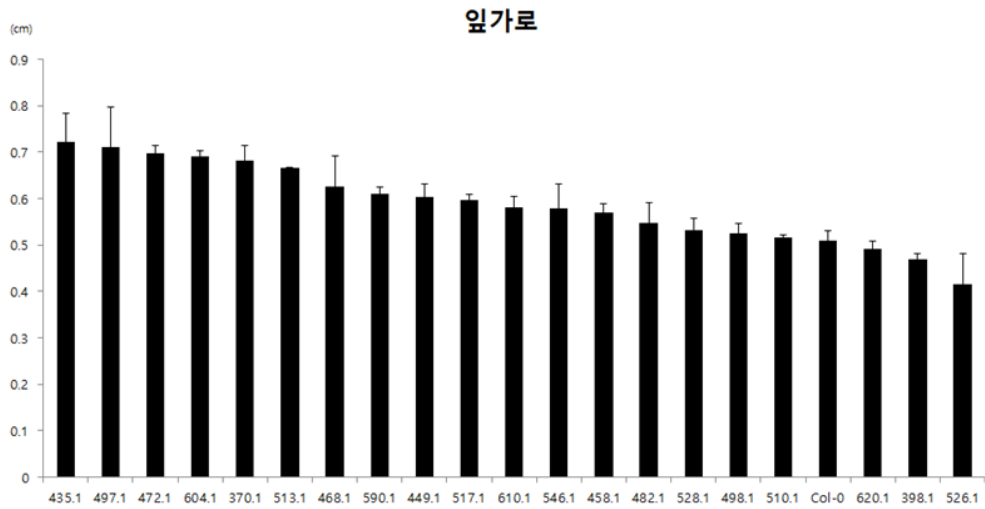


그림 3. 애기장대 생태형의 형태학적 앞가로 표현형. X축 애기장대 생태형. Y축 앞가로. 각 막대는 앞가로를 나타냄. n=9-18



그림 4. 애기장대 생태형을 하프 MS 플레이트에서 토양으로 이식 한 후 1 주 후에 찍은 사진. 앞가로가 긴 생태형 순서. Col-0 컨트롤. 스케일바 1cm.

3-2.3. 애기장대 생태형 잎자루 길이 분석

21 중 생태형의 평균 잎자루 길이는 0.51 cm 였고, 중간값은 0.49 cm 로 확인되었다 (그림 5). 측정한 생태형들 중 상위 20%의 평균 잎자루 길이는 0.69 cm 였고, 하위 20%의 평균은 0.36 cm 였으며, 최상위값을 보인 생태형(435.1)과 최하값의 생태형(517.1)간 차이는 0.4 cm로 확인 되었다 (표 4). 애기장대 생태형 잎자루 길이는 435.1, 370.1, 510.1 순서임을 확인 하였다 (그림 6).

표 4. 생태형 잎자루 분석표. (단위 cm).

Ecotype	평균	표준 편차
Col-0	0.39	0.03
458.1	0.64	0.02
513.1	0.50	0.05
590.1	0.56	0.07
604.1	0.53	0.02
526.1	0.37	0.02
620.1	0.35	0.00
546.1	0.48	0.01
517.1	0.32	0.01
498.1	0.41	0.06
398.1	0.38	0.05
610.1	0.64	0.05
449.1	0.50	0.06
482.1	0.46	0.02
435.1	0.72	0.07
510.1	0.68	0.07
528.1	0.61	0.08
468.1	0.54	0.16
497.1	0.57	0.15
370.1	0.70	0.10
472.1	0.56	0.06

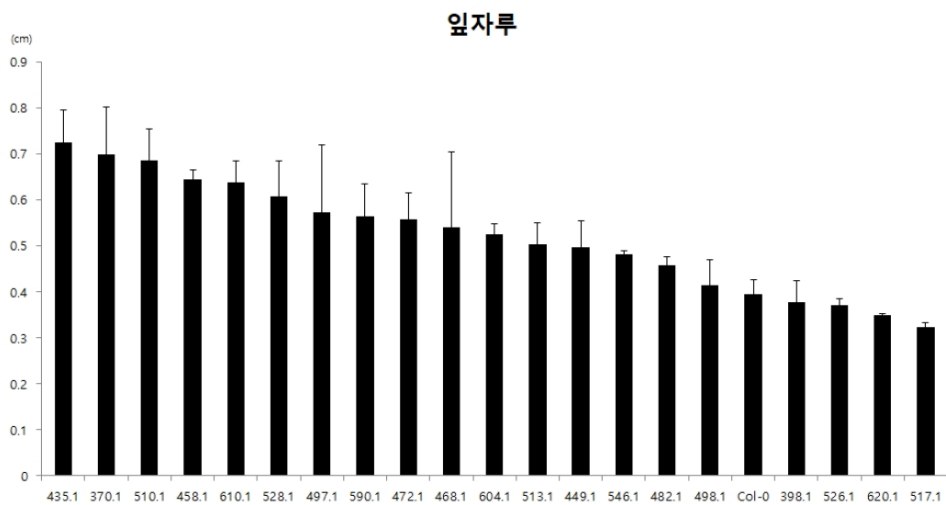


그림 5. 애기장대 생태형의 형태학적 앞자루 표현형. X축 애기장대 생태형. Y축 앞자루 길이. 각 막대는 앞자루 평균 길이를 나타냄. n=9-18



그림 6. 애기장대 생태형을 하프 MS 플레이트에서 1 주 후 토양으로 이식 한 후에 찍은 사진. 잎자루 길이가 긴 생태형 순서. Col-0 컨트롤. 스케일바 1cm

3-2.4. 애기장대 생태형 앞면적 분석

단백질 발현에 최적 생태형 선별을 위해서 유전자 발현 면적을 고려하여 생태형들의 로제트 잎 면적을 확인하였다.

잎길이와 잎자루에서 결과와 마찬가지로 잎 면적에서도 애기장대 370.1 생태형이 잎 면적이 가장 넓고 상위권임을 확인하였으며 생태형 Col-0 는 여전히 하위권에 있는 것을 확인하였다 (그림 7). 잎 면적이 넓은 생태형 순서는 370.1, 497.1, 435.1 임을 확인하였다 (그림 8).

21 종 생태형의 평균 앞면적은 0.4 cm^2 였고, 중간값은 0.39 cm^2 로 확인되었다. 측정한 생태형들 중 상위 20%의 평균 앞면적은 0.55 cm^2 였고, 하위 20%의 평균은 0.24 cm^2 였으며, 최상위값을 보인 생태형(370.1)과 최하값의 생태형(526.1)간 차이는 0.41 cm^2 로 확인되었다 (표 5).

표 5. 생태형 앞면적 분석표. (단위 cm²).

Ecotype	평균	표준편차
Col-0	0.33	0.04
458.1	0.45	0.03
513.1	0.51	0.03
590.1	0.39	0.03
604.1	0.48	0.04
526.1	0.22	0.05
620.1	0.25	0.02
546.1	0.38	0.07
517.1	0.38	0.01
498.1	0.27	0.03
398.1	0.23	0.02
610.1	0.50	0.06
449.1	0.44	0.06
482.1	0.41	0.05
435.1	0.54	0.09
510.1	0.35	0.01
528.1	0.42	0.06
468.1	0.48	0.11
497.1	0.56	0.09
370.1	0.63	0.03
472.1	0.52	0.03

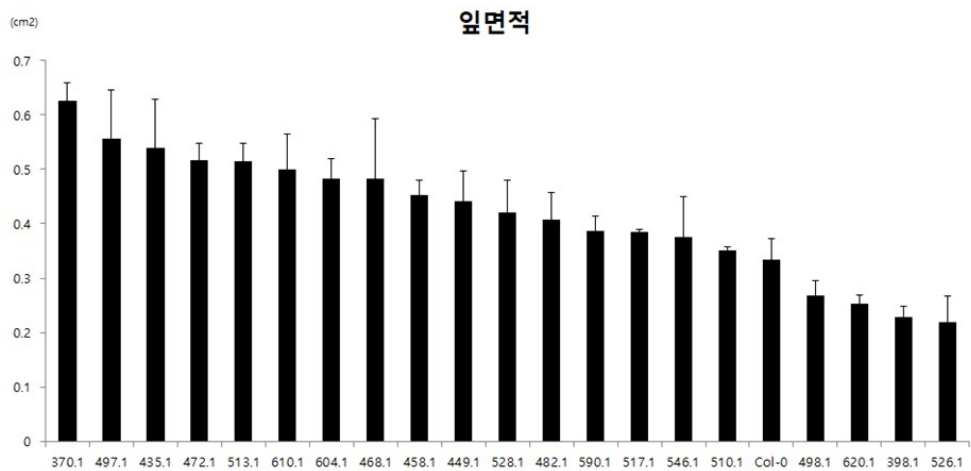


그림 7. 애기장대 생태형의 형태학적 앞면적 평균 크기. X축 애기장대 생태형. Y축 면적 크기. 각 막대는 앞면적 평균 면적을 나타냄. 평방 센티미터 (cm²). n=9-18



그림 8. 애기장대 생태형을 하프 MS 플레이트에서 토양으로 이식 한 후 1 주 후에 찍은 사진. 잎 면적이 넓은 생태형 순서. Col-0 컨트롤. 스케일바 1cm

3-3 로제트 잎 개수 및 생체량 분석

3-3.1 애기장대 생태형 로제트 잎 개수 분석

21 중 생태형의 평균 로제트 잎 개수는 7.7 개 였고, 중간값은 7.8 개로 확인되었다 (그림 9). 측정한 생태형들 중 상위 20%의 평균 로제트 잎 개수는 8.7 개 였고, 하위 20%의 평균은 6.8 개 였으며, 최상위값을 보인 생태형 (497.1)과 최하값의 생태형 (398.1)간 차이는 3.2 개로 확인 되었다 (표 6). 애기장대 생태형 로제트 잎 개수는 497.1 482.1, 435.1 순서임을 확인 하였다.

표 6. 생태형 로제트 잎 개수 분석표. (단위 개수).

Ecotype	평균	표준편차
Col-0	7.1	0.5
458.1	8.1	0.5
513.1	7.4	0.4
590.1	7.5	0.3
604.1	8.4	0.5
526.1	7.3	0.2
620.1	6.8	0.5
546.1	7.3	0.7
517.1	7.1	0.6
498.1	7.7	0.4
398.1	6.1	0.1
610.1	8.0	0.4
449.1	7.8	0.8
482.1	8.8	0.3
435.1	8.8	0.3
510.1	8.6	0.2
528.1	7.9	0.2
468.1	7.8	0.5
497.1	9.2	0.8
370.1	7.2	0.2
472.1	8.3	0.0

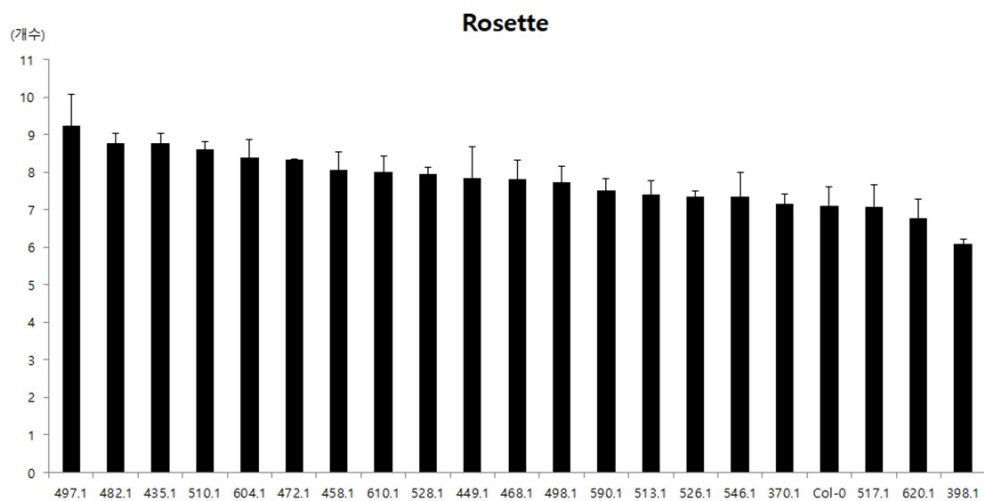


그림 9. 애기장대 생태형의 형태학적 평균 로제트 잎 개수. X축 애기장대 생태형. Y축 로제트 잎 개수. 각 막대는 로제트 잎 개수 평균을 나타냄. 단위 개수. $n=9-18$

3-3.2 애기장대 생태형 생체총량 분석

21 종 생태형의 평균 생체총량은 4.96 g 이고, 중간값은 5.34 g 으로 확인되었다 (그림 10). 측정한 생태형들 중 상위 20%의 평균 생체총량은 8.03 g 이고, 하위 20%의 평균 생체총량은 2.11 g 이었으며, 최상위값을 보인 생태형 (498.1)과 최하값의 생태형 (Col-0)간 차이는 8.47 g 으로 확인 되었다 (표 7).

표 7. 생태형 생체총량 분석표. (단위 g).

Ecotype	생체총량 (g)
498.1	9.4
604.1	8.5
497.1	7.3
620.1	6.9
435.1	6.6
370.1	6.3
528.1	6.1
513.1	5.8
610.1	5.7
546.1	5.3
449.1	4.4
482.1	3.9
458.1	3.8
398.1	2.8
510.1	2.7
526.1	2.7
468.1	2.7
517.1	2.1
Col-0	0.9

생체총량 (g)

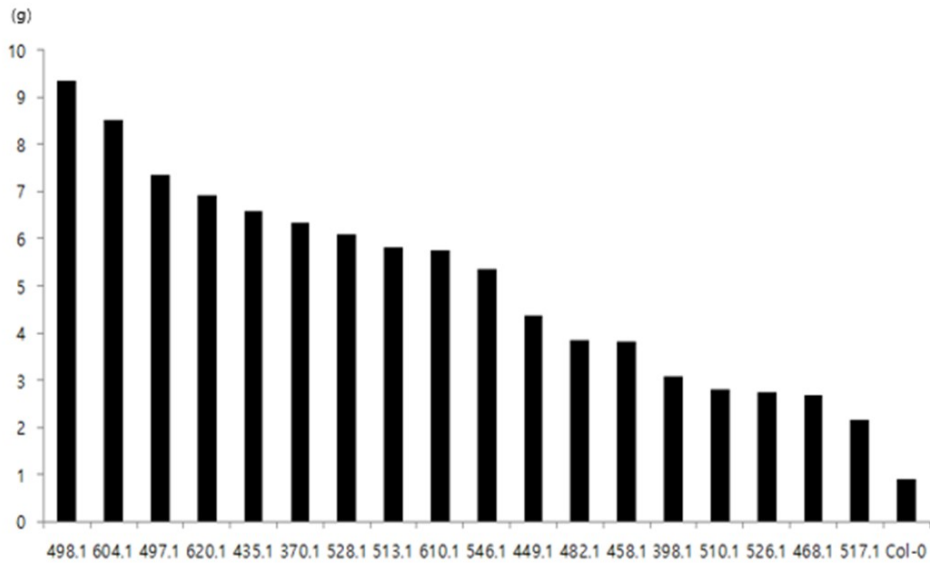


그림 10. 애기장대 생태형의 형태학적 생태총량. X축 애기장대 생태형. Y축 생태총량. 각 막대는 생태총량을 나타냄. 생태형 (374.1, 472.1, 590.1) 측정하지 않았음. 단위 g. n=9-18

3-4 애기장대 생태형별 단백질 함량

21 종 생태형 잎의 1 g 당 평균 단백질 양은 5.85mg 이고, 중간값은 5.6 mg 으로 확인되었다 (표 8). 측정한 생태형들 중 상위 20%의 1 g 당 평균 단백질 양은 7.99 mg 이며, 하위 20%의 평균은 4.49 g 이었으며, 최상위값을 보인 생태형(604.1)과 최하값의 생태형(482.1)간 차이는 4.99 mg 으로 확인 되었다 (그림 11).

표 8. 생태형 1g 당 단백질 양 분석표 (단위 mg).

Ecotype	1g 당 단백질 양 (mg)
604.1	8.84
546.1	8.11
497.1	7.53
498.1	7.49
398.1	6.29
620.1	6.14
370.1	6.07
610.1	5.92
517.1	5.85
513.1	5.60
528.1	5.45
458.1	5.27
449.1	5.05
468.1	4.94
Col-0	4.94
526.1	4.91
510.1	4.72
435.1	4.25
482.1	3.85

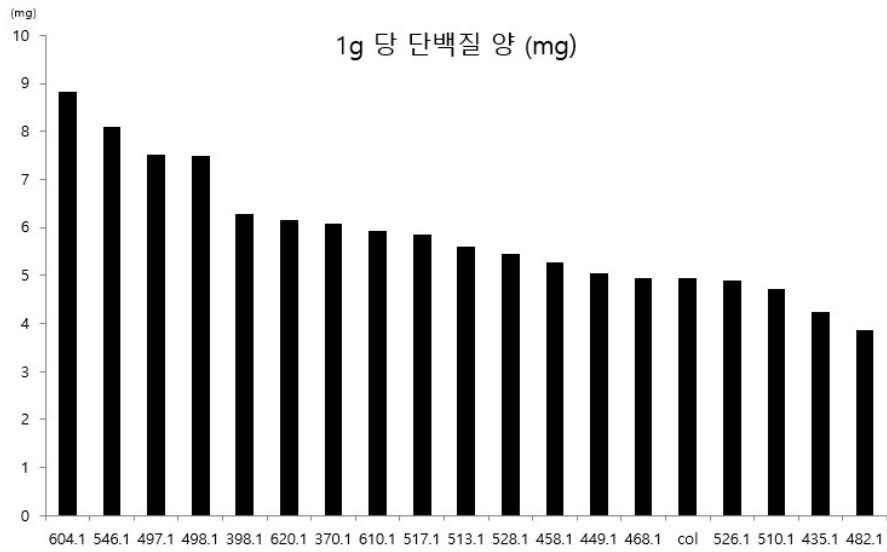


그림 11. 애기장대 생태형의 1 g당 단백질 양. X축 애기장대 생태형. Y축 단백질 양. 각 막대는 1 g당 단백질 양을 나타냄. 단위 mg. n=9-18

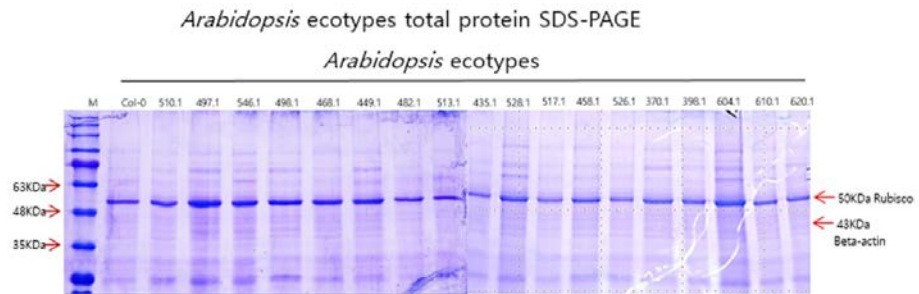


그림 12. 애기장대 생태형 전체 단백질의 SDS-PAGE 젤 비교. 50KDa Rubisco. 43KDa Beta-actin.

3-5 생태형 형질전환 효율 분석

생태형에 따른 형질전환 효율 측정은 보유하고 있던 GUL1::GUL1-GUS 재조합 DNA (그림 13)를 화침법을 통해 형질전환 시킨 후, 항생제 저항성을 나타내는 발아 종자수를 측정하는 과정으로 진행되었다.

21 중 생태형 형질전환 효율은 평균 0.75 % 확인되었다 (표 9). 측정한 생태형들 중 상위 20%의 평균 형질전환은 1.67 %이며, 하위 20 %의 평균은 0.32 % 였으며, 최상위값을 보인 생태형(449.1)은 2.8 % 이며, 최하값의 생태형 (472.1)은 0.1 % 로 확인 되었다 (그림 13). 형질전환 후 배양실에서 배양하는 과정에서 생태형 (497.1, 604.1, 610.1, 498.1, 590.1, 546.1, 620.1) 7 종이 씨가 맺지 않으며 말라 죽는 것을 확인하였다.

표 9. 생태형 형질전환 효율 분석표 (단위 %).

Ecotype	Transformation efficiency (%)
449.1	2.8
398.1	1.5
482.1	1.4
370.1	1
510.1	1
458.1	0.9
513.1	0.8
528.1	0.7
526.1	0.7
468.1	0.6
435.1	0.5
Col-0	0.4
517.1	0.3
472.1	0.1

Transformation efficiency (%)

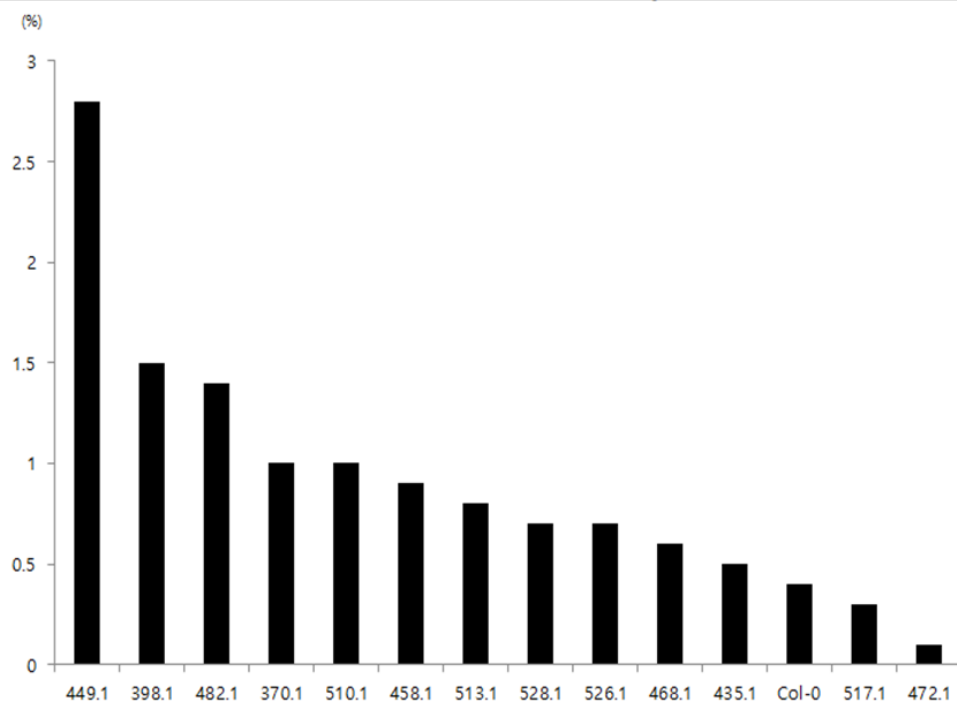


그림 13. 애기장대 생태형의 형질전환 효율. 단위 %. (생태형 7종 제외).

4. 논 의

21 종의 애기장대 생태형의 수집된 결과는 생태형들 사이에서 로제트 잎 구조뿐만 아니라 잎의 형태와 크기에 존재하는 우수한 표본을 구성한다. 아마도 이 다양성의 일부는 개화 시점의 다양성으로 인해 발생했을 것이며, 이는 지속적으로 생성되는 로제트 잎 수에 차이를 유발했을 것이다. 또한 잎의 형태 형성을 조절하는 유전자의 활성도의 차이는 식물의 잎 모양과 크기, 형질의 자연적 변화를 보일 것이며 표현형의 다양성도 환경에 의해 영향을 받는 몇몇 유전자의 공동 작용 때문일 것이다. 환경적인 기질들인 빛, 온도 및 습도 등을 통제함으로써 환경적 표현형 변이를 줄임으로써 연구중인 형질의 유전적 구성 요소를 풀어 낼 수 있다.

몇몇 생활사 형질의 inter- and intra ecotypic 변이성에 관한 연구가 있는데 예를 들어, 잎 원시 발달의 타이밍 및 조절된 배양 조건 하에서 성장한 애기장대에서의 잎의 수의 관한 연구가 있다 (Dobrovolna 1967; Zwanet al. 2000). Karbe 와 Röbbelen (1968)은 비슷한 결과를 얻었는데 Rosette 높이와 잎의 수, 모양, 가장자리 구성 및 색을 연구 하였다.

잎 성장은 5 단계가 함께 상호 연결 단계의 연속이다: 개시 단계, 일반적인 세포 분열 단계, 전이 단계, 세포 확장 단계 및 유사분열조직의 분열 단계이다 (Nathalie Gonzalez et al., 2012).

식물 기관의 성장에 중요한 매개 변수 두 가지가 있다: 세포 수와 세포 크기이다.

이 두 가지 변수에 따라 식물은 기관 크기와 모양이 변경되어 나타난다. 예를 들어, AINTEGUMENTA 유전자를 과 발현 시킨 식물에서는 세포 분열 속도의 증가와 큰 식물 기관을 만들었다(Mizukami and Fischer, 2000). 대조적으로 axr2 돌연변이 식물체에서는 세포 수는 유지하였지만 세포 크기와 식물 기관 크기는 줄어들었다(Timpte et al., 1992). 세포 크기는 세포질 배수 수준과 배수 수준의 증가와 연결되어 있다. 예를 들어 4 배체 식물에서는 더 큰 세포로 이어지고 더 큰 기관을 가진 식물에 이르게 한다(Kondorosi et al., 2000).

광형태 형성의 유전적 조절에 따라 잎과 잎자루의 차이가 있다. 광 수용체인 피토크롬 (Phytochrome)은 많은 식물종에서 잎의 확장과 잎자루의 신장을 조절한다 (McLaren and Smith 1978, Morgan and Smith 1979, Child et al. 1981, Duke and Lane 1984). 애기장대는 광주기 말기에 far-red light 으로 조사 될 때, shade-avoidance syndrome 을 보이고 잎자루의 신장과 잎몸이 충분히 전개되지 않는다 (Goto et al. 1991). 이것으로 보아 잎의 잎자루와 잎몸의 발달이 애기장대에서의 성장 조절 phytochrome-mediated (Phymediated) 메커니즘에 의해 다르게 영향을 받는다는 것을 알려준다.

잎의 질량의 증가는 잎 면적 또는 잎이 두꺼워지기 때문이다; 총 잎 질량의 증가는 잎 면적 성장과 잎 두께의 질량 증가량의 합이다 (Sarathi M. Weraduwa et al., 2015).

아그로박테리움 형질전환방법 중 화학방법은 쉽고 저렴하며 빠른 프로토콜로 인해 가장 자주 사용한다. 그럼에도 불구하고 모든 애기장대 생태형에서 효율적이지는 않다. 뿌리를 이용한 형질전환에서는 애기장대 생태형 C24 와 Wassilewskija (Ws)는 효율적으로 형질 전환되며, Landsberg erecta (Ler)와 Columbia (Col-0)는 C24 와 Ws 만큼 효율적이지 않다 (Valvekens et al. 1988; unpublished results). 반면, Col-0 은 화학방법으로 효율적으로 형질 전환되지만 애기장대 생태형 Ler 은 10 배에서 100 배 낮은 비율로 형질전환 된다 (Clough and Bent 1998).

애기장대 생태형별 측정 자료를 종합하여 보면 잎 길이에서 가장 긴 생태형 370.1 이 페티올 길이에서 상위권에 있으며 잎 면적에서도 가장 길고 형질전환 효율에서 상위권임을 알 수 있었다. 생태형 435.1 은 잎 가로와 페티올 길이에서 가장 긴 것으로 확인되며 잎 면적, Rosette 개수 그리고 생체총량에서 상위권에 있음을 확인 하였다. 생태형 497.1 은 Rosette 개수에서 가장 많은 잎 수를 가지고 있으며 잎길이, 잎 가로, 잎면적, 생체총량, 그리고 단백질 양에서 상위권에 있는 것을 알게 되었다. 마지막으로 생태형 604.1 은 단백질 양에서

가장 높고 생체총량 Rosette 잎 개수에서 상위권에 있는 것을 확인하였다.

재조합 단백질 발현 시스템 적용에 유용한 (유전자 발현 면적 측면을 고려, 식물의 잎이 크고 넓은 것) 생태형 (21 종, Col-0 포함)을 선별 후 잎길이, 잎넓이, 잎면적, 잎자루, 잎의 개수(rosette)을 측정과 아그로박테리움을 이용한 일시적 발현 방법을 통한 외래유전자의 도입 효율 및 도입 유전자들의 단백질 발현 양상을 연구한 결과 애기장대 생태형 370.1, 435.1 이 가장 적합한 것으로 생각된다.

5. 참 고 문 헌

Akama, K., Shiraishi, H., Ohta, S., Nakamura, K., Okada, K., & Shimura, Y. (1992). Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana*: comparison of the efficiencies with various organs, plant ecotypes and *Agrobacterium* strains. *Plant cell reports*, 12(1), 7–11.

Alonso-Blanco, C., Andrade, J., Becker, C., Bemm, F., Bergelson, J., Borgwardt, K. M., ... & Ecker, J. R. (2016). 1,135 genomes reveal the global pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 166(2), 481–491

Bai, Y., Falk, S., Schnittger, A., Jakoby, M. J., & Hülskamp, M. (2010). Tissue layer specific regulation of leaf length and width in *Arabidopsis* as revealed by the cell autonomous action of *ANGUSTIFOLIA*. *The Plant Journal*, 61(2), 191–199

Barber, J. (2009) Photosynthetic energy conversion: natural and artificial. *Chem. Soc. Rev.* 38, 185–196

Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal*, 16(6), 735–743.

Chung, M. H., Chen, M. K., & Pan, S. M. (2000). Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis*. *Transgenic research*, 9(6), 471–486.

Child, R., & Smith, H. (1987). Phytochrome action in light-grown mustard: kinetics, fluence-rate compensation and ecological significance. *Planta*, 172(2), 219–229

Desfeux, C., Clough, S. J., & Bent, A. F. (2000). Female Reproductive Tissues Are the Primary Target of *Agrobacterium*-Mediated Transformation by the *Arabidopsis* Floral-Dip Method. *Plant physiology*, 123(3), 895–904

Dobrovolna, J. (1967). The variability of developmental characters in natural populations of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Arabidopsis Inf. Serv.*, 4, 6–7.

Duke, S. O., & Lane, A. D. (1984). Phytochrome control of its own accumulation and leaf expansion in tentoxin- and norflurazon-treated mung bean seedlings. *Physiologia Plantarum*, 60(3), 341–346.

Goto, N., Kumagai, T., & Koornneef, M. (1991). Flowering responses to light-breaks in photomorphogenic mutants of *Arabidopsis thaliana*, a long-day plant. *Physiologia Plantarum*, 83(2), 209–215

Ghedira, R., De Buck, S., Nolf, J., & Depicker, A. (2013). The efficiency of *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation is determined not only by the *Agrobacterium* strain used but also by the physiology and the ecotype of the dipped plant. *Molecular plant-microbe interactions*, 26(7), 823–832.

Gonzalez, N., Vanhaeren, H., & Inzé, D. (2012). Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends in plant science*, 17(6), 332–340.

Hirokazu Tsukaya, Toshiaki Kozuka, Gyung-Tae Kim, Genetic Control of Petiole Length in *Arabidopsis thaliana*, Plant and Cell Physiology, Volume 43, Issue 10, 15 October 2002, Pages 1221–1228,

Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., & Vreugdenhil, D. (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 141–172

Kawakatsu, T., Huang, S. S. C., Jupe, F., Sasaki, E., Schmitz, R. J., Urich, M. A., ... & Chen, H. (2016). Epigenomic diversity in a global collection of *Arabidopsis thaliana* accessions. *Cell*, 166(2), 492–505.

Kondorosi, E., Roudier, F., & Gendreau, E. (2000). Plant cell-size control: growing by ploidy?. *Current opinion in plant biology*, 3(6), 488–492.

Karbe, C., & Röbbelen, G. (1968). Variation of plant size and other morphological characters in natural populations of *Arabidopsis*. *Arabidopsis Inf. Serv.*, 5, 13–15

Morgan, D. C., & Smith, H. (1979). A systematic relationship between phytochrome-controlled development and species habitat, for plants grown in simulated natural radiation. *Planta*, 145(3), 253–258.

McLaren, J. S., & SMITH, H. (1978). Phytochrome control of the growth and development of *Rumex obtusifolius* under simulated canopy light environments. *Plant, Cell & Environment*, 1(1), 61–67.

Martínez-García, J. F., Monte, E., & Quail, P. H. (1999). A simple, rapid and quantitative method for preparing *Arabidopsis* protein extracts for immunoblot analysis. *The Plant Journal*, 20(2), 251–257.

Mizukami, Y., & Fischer, R. L. (2000). Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 942–947

Omidbakhshfard, M. A., Fujikura, U., Olas, J. J., Xue, G. P., Balazadeh, S., & Mueller-Roeber, B. (2018). *GROWTH-REGULATING FACTOR 9* negatively regulates *arabidopsis* leaf growth by controlling *ORG3* and restricting cell proliferation in leaf primordia. *PLoS genetics*, 14(7), e1007484

Pérez-Pérez, J. M., Serrano-Cartagena, J., & Micol, J. L. (2002). Genetic analysis of natural variations in the architecture of *Arabidopsis thaliana* vegetative leaves. *Genetics*, 162(2), 893–915

Page, D. R., & Grossniklaus, U. (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics*, 3(2), 124.

Röbbelen, G. (1971). Further data on the extent of outcrossing in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Inf. Serv.*, 8, 7.

Schmuths, H., Bachmann, K., Weber, W. E., Horres, R., & Hoffmann, M. H. (2006). Effects of preconditioning and temperature during germination of 73 natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of botany*, 97(4), 623–634.

Smith, H., & Whitelam, G. C. (1997). The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell & Environment*, 20(6), 840–844.

Tsuda, K., Qi, Y., Nguyen, L. V., Bethke, G., Tsuda, Y., Glazebrook, J., & Katagiri, F. (2012). An efficient *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 69(4), 713–719.

Timpte, C. S., Wilson, A. K., & Estelle, M. (1992). Effects of the *axr2* mutation of *Arabidopsis* on cell shape in hypocotyl and inflorescence. *Planta*, 188(2), 271–278.

Valvekens, D., Van Montagu, M., & Van Lijsebettens, M. (1988). *Agrobacterium tumefaciens*–mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(15), 5536–5540

Weigel, D., & Mott, R. (2009). The 1001 genomes project for *Arabidopsis thaliana*. *Genome biology*, 10(5), 107.

Weigel, D. (2012). Natural variation in *Arabidopsis*: from molecular genetics to ecological genomics. *Plant physiology*, 158(1), 2–22.

Weraduwaage, S. M., Chen, J., Anozie, F. C., Morales, A., Weise, S. E., & Sharkey, T. D. (2015). The relationship between leaf area growth and biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 6, 167

Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006). *Agrobacterium*–mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature protocols*, 1(2), 641

Zhu, X–G. et al. (2010) Improving photosynthetic efficiency for greater yield. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 235–261

Zwan, C. V., Brodie, S. A., & Campanella, J. J. (2000). The intraspecific phylogenetics of *Arabidopsis thaliana* in worldwide populations. *Systematic Botany*, 47–59.

6. ABSTRACT

Arabidopsis ecotypic variation of protein contents

Sungyeon Bong

Department of Biological Sciences

SEOUL NATIONAL UNIVERSITY

Arabidopsis thaliana is a model plant for molecular genetics research belongs to the Brassicaceae. *Arabidopsis* are smaller in size and has relatively shorter periods, and they can produce many seeds that is also useful in the statistical analysis. The genome has relatively smaller size, and has diploid characteristics compared with other plants. Even with the unintended expose of the plant to the environment, it is at low risk of intake to the body, because of its 'non-edible' status. Also, the growing conditions are well established, and it is possible to grow efficiently even with low light. By maximizing the cultivated area in the plant factory, it is possible to establish the most efficient productivity per unit area. It is possible to select the most efficient ecotype for protein expression because there are many types of ecotype exist. Furthermore, there

is advantage of identify the plant-specific sugar chain structure because full genomic sequence is already known. For these advantages, the model plant plays important roles in all aspects of plant biology. Agrobacterium is a remarkably time-efficient and simple method for delivering DNA into plant tissue to a transient gene expression and boasts a high throughput. Prior to the transient expression experiments, approximately 200 of applicable transient expression ecotypes are selected by observing ecological growth patterns and phenotype for different Arabidopsis ecotypes. (increase in size of the leaf assumed to produce more protein). It is still in process of verifying the transient expression of the protein expression efficiency, under growth room system of culture using Agrobacterium.

Key words : Arabidopsis ecotype, Agrobacterium tumefaciens,, Floral dip, Protein expression, Transformation

Student number : 2015-22635